

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
15 de Enero de 2004 (15.01.2004)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2004/005494 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes⁷: C12N 5/02,
5/08, A61K 35/34, A61P 21/00

CARDOSO, Felipe [ES/ES]; Avda Pío XII, 53, E-31008
Pamplona (ES). HERREROS GONZALEZ, Jesús
[ES/ES]; Avda Pío XII, 53, E-31008 Pamplona (ES).

(21) Número de la solicitud internacional:

PCT/ES2003/000285

(22) Fecha de presentación internacional:

11 de Junio de 2003 (11.06.2003)

(25) Idioma de presentación:

español

(26) Idioma de publicación:

español

(30) Datos relativos a la prioridad:

P200201540 2 de Julio de 2002 (02.07.2002) ES

(81) Estados designados (*nacional*): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO,
RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ,
UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (*regional*): patente ARIPO (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), patente
euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
patente europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE,
SI, SK, TR), patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Solicitante (*para todos los Estados designados salvo US*):
INSTITUTO CIENTIFICO Y TECNOLOGICO DE
NAVARRA, S.A. [ES/ES]; Avda Pío XII, 53, E-31008
Pamplona (ES).

(71) Solicitante e

(72) Inventor: CHACQUES, Juan, Carlos [AR/ES]; Avda Pío
XII, 53, E-31008 Pamplona (ES).

Publicada:

— con informe de búsqueda internacional

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (*para US solamente*): PROSPER

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección
"Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al
principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.

(54) Title: MEDIUM FOR CULTURING AUTOLOGOUS HUMAN PROGENITOR STEM CELLS AND APPLICATIONS
THEREOF

(54) Título: MEDIO DE CULTIVO DE CÉLULAS MADRE-PROGENITORAS AUTÓLOGAS HUMANAS Y SUS APLICA-
CIONES

(57) Abstract: The invention relates to a medium for the autologous culture of autologous human progenitor stem cells, which
comprises: between 0.1 and 90 wt.-% autologous human serum; between 0.1 and 10,000 UI/ml heparin; between 0.1 and 10,000
UI/ml protamine; and a culture medium consisting of basic nutrients with or without glutamine, in a sufficient quantity to make
up 100 wt.-%, which can be used to culture and expand autologous human progenitor stem cells. Compositions containing said
cells can be implanted in the patient using an autologous cellular cardiomyoplasty method in order to create, regenerate and repair
dysfunctional myocardial tissue.

(57) Resumen: El medio de cultivo autólogo de células madre-progenitoras autólogas humanas comprende: entre 0,1% y 90% en
peso de suero humano autólogo; entre 0,1 y 10.000 UI/ml de heparina; entre 0,1 y 10.000 UI/ml de protamina; y un medio de cultivo
con nutrientes básicos con o sin glutamina, en cantidad suficiente hasta el 100% en peso, y es útil para cultivar y expandir células
madre-progenitoras autólogas humanas. Composiciones conteniendo dichas células pueden ser implantadas en el paciente mediante
un procedimiento de cardiomioplastia celular autóloga para crear, regenerar y reparar tejido miocárdico disfuncional.

WO 2004/005494 A1

MEDIO DE CULTIVO DE CÉLULAS MADRE-PROGENITORAS AUTÓLOGAS HUMANAS Y SUS APLICACIONES

CAMPO DE LA INVENCION

5 La invención se relaciona, en general, con la obtención y manipulación de células madre-progenitoras autólogas humanas bajo condiciones que permiten su empleo en terapia celular. En particular, la invención se refiere a un medio de cultivo autólogo para el cultivo de dichas células y a su empleo en el cultivo y expansión de dichas células así como a composiciones que las contienen.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

 Uno de los mayores retos para la investigación biomédica radica en desarrollar estrategias terapéuticas que permitan reemplazar o reparar las células o tejidos dañados o destruidos en las enfermedades más devastadoras o discapacitantes: enfermedades
15 neurodegenerativas (Parkinson, Alzheimer), diabetes, enfermedades musculares y cardíacas, insuficiencia hepática, etc.

 Una de las estrategias terapéuticas más prometedoras es la Terapia Celular, fundamentada en el hecho comprobado de que es posible disponer de células, más o menos indiferenciadas, capaces de dividirse generando células diferenciadas funcionales,
20 y, en algunos casos, incluso de regenerarse. Entre éstas se incluyen las células madre y las células progenitoras/precursoras, que, en su conjunto, serán denominadas células madre-progenitoras. Estas células pueden encontrarse en el embrión e incluso en tejidos adultos. La terapia celular consiste, por tanto, en el trasplante o implante en el paciente de una cantidad de células madre-progenitoras suficiente para reparar y restaurar la
25 funcionalidad de un órgano dañado.

 Una de las formas de terapia celular propuestas está basada en el empleo de células-madre progenitoras procedentes del adulto, obtenidas de un animal (células xenogénicas), de un donante (células alogénicas), u obtenidas del propio paciente (células autólogas). El uso de células madre-progenitoras autólogas estaría libre de
30 algunos de los inconvenientes de las otras formas de terapia celular, tales como escasez de donantes, necesidad de tratamiento inmunosupresor para evitar el rechazo por el paciente, así como de los condicionantes éticos asociados con el uso de células embrionarias.

Sin embargo, para que la terapia celular se convierta en una realidad es necesario desarrollar un mayor conocimiento sobre cuáles son las células idóneas en cada caso y cómo identificarlas, y también desarrollar procedimientos para una adecuada manipulación de las células madre-progenitoras que las haga idóneas para su uso clínico.

- 5 La cardiomioplastia (CMP) celular autóloga es un ejemplo concreto de terapia celular para el tratamiento de enfermedades cardíacas (enfermedad isquémica, insuficiencia cardíaca, etc.). Una descripción general actualizada puede encontrarse en *Curr. Control. Trials Cardiovasc Med.* 2001; 2:208-210 (D.A. Taylor). Procedimientos y composiciones para el aislamiento, cultivo, expansión y empleo de diferentes células madre-progenitoras útiles en CMP celular pueden encontrarse en US5130141, 10 WO/0107568, WO/0194555, WO79854301, US2001/0038837 y US5543318.

COMPENDIO DE LA INVENCION

- La invención se enfrenta, en general, con el problema de proporcionar células madre-progenitoras autólogas humanas, adecuadas para su empleo en terapia celular, y, 15 en particular, con el problema de proporcionar un procedimiento para una adecuada manipulación de las células madre-progenitoras que las haga idóneas para su uso clínico, incluyendo procedimientos específicos para su obtención, cultivo, purificación y expansión.

- 20 La solución proporcionada por esta invención se basa en el hecho de que los inventores han observado que el empleo de un medio de cultivo autólogo, que comprende suero autólogo humano y nutrientes, junto con un anticoagulante y un agente para revertir la anticoagulación, permite el cultivo *in vitro*, la purificación y expansión de células madre-progenitoras autólogas humanas, las cuales pueden ser utilizadas en la 25 elaboración de composiciones farmacéuticas para el tratamiento de diversas patologías mediante terapia celular.

- La invención se ilustra mediante la obtención de un medio de cultivo autólogo, que comprende nutrientes, suero autólogo humano, heparina y protamina, y su empleo en el cultivo *in vitro*, purificación y expansión de células madre-progenitoras musculares 30 autólogas humanas útiles para la elaboración de composiciones farmacéuticas adecuadas para el tratamiento de cardiomiopatías tanto isquémicas como idiopáticas mediante CMP celular autóloga.

Un aspecto de esta invención se relaciona con un medio de cultivo de células

madre-progenitoras autólogas humanas que comprende suero humano autólogo y nutrientes, junto con un anticoagulante y un agente para revertir la anticoagulación.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la preparación de dicho medio de cultivo de células madre-progenitoras autólogas humanas. En una
5 realización particular, el suero humano autólogo presente en dicho medio de cultivo ha sido obtenido por plasmaféresis.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo de dicho medio de cultivo para el cultivo *in vitro*, purificación y expansión de células madre-progenitoras autólogas humanas.

10 En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la obtención de una composición de células madre-progenitoras autólogas humanas, que comprende incubar dichas células madre-progenitoras autólogas humanas en dicho medio de cultivo y purificar las células madre-progenitoras autólogas humanas obtenidas.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la obtención de
15 una composición de células madre-progenitoras musculares autólogas humanas, útiles para su empleo en terapia celular, que comprende incubar dichas células madre-progenitoras musculares autólogas humanas en dicho medio de cultivo y purificar las células madre-progenitoras musculares autólogas humanas obtenidas.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una composición enriquecida en
20 células madre-progenitoras musculares autólogas humanas.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una composición farmacéutica que comprende células madre-progenitoras musculares autólogas humanas, junto con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método terapéutico de CMP
25 celular autóloga para crear, regenerar y reparar tejido miocárdico disfuncional mediante el implante de una composición farmacéutica que comprende células madre-progenitoras musculares autólogas, regeneradoras de tejido cardíaco, expandidas y mantenidas *ex vivo* en un medio de cultivo autólogo.

30 DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

La Figura 1 es un diagrama de barras que representa la valoración de la función ventricular izquierda por análisis de la fracción de eyección ventricular izquierda (LVEF), calculada mediante ecocardiograma bidimensional (2D) y de detección

automática de bordes (ABD), antes del procedimiento quirúrgico (Basal), a los 40 días de seguimiento después del trasplante celular (40 días) y a los 3 meses del seguimiento (3 meses).

La Figura 2 muestra la valoración de la perfusión mediante PET con ^{13}N -amonio y del metabolismo de glucosa mediante PET ^{18}F -FDG, antes del procedimiento quirúrgico (Basal) y a los 3 meses del trasplante celular (FU 3 meses) Figura 2A: Imágenes correspondientes al paciente N°5 como ejemplo representativo de un paciente que recibió trasplante celular. Figura 2B: Imágenes correspondientes al corazón del paciente N° 9 que no recibió trasplante celular (por contaminación del cultivo de células miogénicas esqueléticas). Las flechas indican tejido infartado, antes y después de la cirugía.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

1. Medio de cultivo autólogo

En un primer aspecto, la presente invención se relaciona con un medio de cultivo autólogo de células madre-progenitoras autólogas humanas, en adelante "medio de cultivo autólogo de la invención", que comprende:

- a) entre 0,1% y 90% en peso de suero humano autólogo;
- b) entre 0,1 y 10.000 UI/ml de heparina;
- c) entre 0,1 y 10.000 UI/ml de protamina; y
- d) un medio de cultivo con nutrientes básicos con o sin glutamina, en cantidad suficiente hasta el 100% en peso.

El medio de cultivo autólogo de la invención es un medio de cultivo completo elaborado a partir de suero humano autólogo obtenido del propio paciente objeto del posterior implante de las células madre-progenitoras autólogas humanas. El suero humano autólogo, si se desea, puede ser sometido a un tratamiento convencional, por ejemplo, tratamiento térmico, con el fin de inactivar el complemento.

El suero autólogo humano puede ser obtenido del propio paciente objeto del posterior implante de las células madre-progenitoras autólogas humanas mediante cualquier método convencional, por ejemplo, a partir de muestras sanguíneas del paciente o bien, preferentemente, mediante la realización de una plasmaféresis a dicho paciente. En una realización particular de esta invención, la plasmaféresis se realiza utilizando heparina como anticoagulante y sulfato de protamina para revertir la

anticoagulación. Como es conocido, las plasmaféresis se realizan utilizando, habitualmente, ACD (solución Anticoagulante-Citrato-Dextrosa) [por ejemplo, para 1 litro de agua se añade ácido cítrico monohidrato (8 g), citrato (22 g) y glucosa monohidrato (24,5 g)] como anticoagulante. Este anticoagulante aporta quelante del calcio por lo que para revertir el efecto del ACD y obtener suero a partir de la plasmaféresis es necesario añadir calcio lo cual interfiere posteriormente en el cultivo celular. La realización de una plasmaféresis permite obtener un suministro de suero significativamente elevado, superior al obtenido a partir de muestras sanguíneas del paciente, puesto que en la plasmaféresis no hay pérdida de sangre del paciente, lo que supone un beneficio importante para el paciente. Además, la utilización del suero obtenido mediante plasmaféresis con heparina y protamina posibilita su utilización en el medio de cultivo sin problemas posteriores en el cultivo celular.

El medio de cultivo autólogo de la invención contiene los nutrientes básicos y, opcionalmente, glutamina. Existen medios comercialmente disponibles que aportan los nutrientes necesarios para el cultivo celular. En principio, cualquier medio que proporcione los nutrientes adecuados para el cultivo celular puede ser utilizado en la presente invención. En una realización particular, los nutrientes son aportados por el medio HAM F12 [GIBCO BRL].

En una realización particular, el medio de cultivo autólogo de la invención contiene, además, un antibiótico. Prácticamente cualquier antibiótico podría ser utilizado en la presente invención. En una realización particular, el medio de cultivo autólogo de la invención comprende un antibiótico seleccionado entre penicilina, estreptomicina, gentamicina y sus mezclas. Asimismo, el medio de cultivo autólogo de la invención también puede contener, si se desea, un agente antifúngico, por ejemplo, anfotericina B, y/o un factor de crecimiento, por ejemplo, un factor de crecimiento de fibroblastos tal como el factor de crecimiento fibroblástico básico humano (bFGF) nativo o recombinante.

En una realización particular, el medio de cultivo autólogo de la invención comprende:

- 89% en peso de medio HAM-F12;
- 10% de suero humano autólogo del paciente;
- heparina 0,1-10.000 UI/mL;
- protamina 0,1 a 10.000 UI/mL; y

1% de penicilina/estreptomicina y, opcionalmente,
0,25 mg/ml de anfotericina B y/o
0,1 a 250 pg/ml de bFGF recombinante.

5 2. Método para la preparación del medio de cultivo autólogo de la invención

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la preparación del medio de cultivo de células madre-progenitoras autólogas humanas proporcionado por esta invención, que comprende mezclar y homogeneizar los distintos componentes del mismo.

10 Ventajosamente, dicho suero humano autólogo se obtiene por plasmaféresis, tal como se ha mencionado previamente, utilizando heparina como anticoagulante para obtener plasma y protamina para revertir la anticoagulación y obtener el suero. De esta manera, el suero humano autólogo obtenido ya contiene la heparina y protamina.

15 3. Empleo del medio de cultivo autólogo de la invención

En otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo del medio de cultivo autólogo de la invención para el cultivo *in vitro*, purificación y expansión de células madre-progenitoras autólogas humanas:

El empleo de suero autólogo humano en un medio de cultivo para la expansión
20 de células madre-progenitoras autólogas humanas presenta numerosas ventajas, por ejemplo, la expansión celular puede realizarse en cualquier parte del mundo, sin el riesgo de contaminación con priones, virus o zoonosis inherente a las técnicas tradicionales de cultivo celular que utilizan suero bovino fetal para el crecimiento celular. El empleo de suero autólogo humano en cultivos de células humanas en lugar de
25 suero bovino presenta numerosas ventajas ya que (i) evita la reacción antígeno-anticuerpo, (ii) evita las reacciones inflamatorias causadas por proteínas heterólogas; y (iii) evita la destrucción celular como consecuencia de los repetidos lavados que necesitan las células cultivadas en suero bovino antes de su administración a los seres humanos. De hecho, la experiencia clínica actual, con CMP celular autóloga ha
30 demostrado la presencia de arritmias ventriculares malignas en pacientes 2 semanas después de la terapia con células cultivadas en suero bovino complicación que, en el 40% de los casos, ha requerido el implante de desfibriladores.

4. Método para la preparación de una composición de células madre-progenitoras autólogas humanas

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la preparación de una composición de células madre-progenitoras autólogas humanas, que comprende
5 incubar dichas células madre-progenitoras autólogas humanas en el medio de cultivo autólogo de la invención y purificar las células madre-progenitoras autólogas humanas obtenidas.

Prácticamente cualquier célula madre-progenitora autóloga humana puede ser cultivada y expandida en el medio de cultivo autólogo de la invención, adaptando en
10 cada caso las condiciones del medio y del cultivo al tipo celular concreto. No obstante, en una realización particular, que se describirá con detalle en el siguiente apartado, dichas células madre-progenitoras autólogas humanas son células madre-progenitoras musculares autólogas humanas.

Las células madre-progenitoras autólogas humanas pueden obtenerse mediante la
15 realización de una biopsia en el propio paciente objeto del posterior implante de tales células madre-progenitoras autólogas humanas.

La incubación de las células madre-progenitoras autólogas humanas en el medio de cultivo autólogo de la invención se realiza mediante condiciones que permiten el crecimiento y división celular.

20 La purificación de las células madre-progenitoras autólogas humanas obtenidas puede realizarse por cualquier método convencional. En una realización particular, la purificación de dichas células madre-progenitoras autólogas humanas consiste en una inmunopurificación y se realiza mediante el empleo de anticuerpos específicos y selectivos para dichas células madre-progenitoras autólogas humanas, que permiten la
25 identificación de antígenos extracelulares característicos de dichas células madre-progenitoras autólogas humanas. Ventajosamente, dichos anticuerpos específicos y selectivos para dichas células madre-progenitoras autólogas humanas están unidos a microesferas magnéticas para purificar y enriquecer las células madre-progenitoras autólogas humanas mediante un clasificador celular magnético.

30 Las células madre-progenitoras autólogas humanas, obtenidas según el procedimiento previamente descrito, pueden presentarse en forma de composiciones farmacéuticas, y pueden ser utilizadas en terapia génica.

5. Método para la obtención de células madre-progenitoras musculares autólogas humanas

Como se ha mencionado previamente, en una realización particular y preferida de esta invención, las células madre-progenitoras autólogas humanas son células madre-progenitoras musculares (o células miogénicas) autólogas humanas.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la obtención de células madre-progenitoras musculares autólogas humanas, adecuadas para su empleo en terapia celular, que comprende incubar dichas células madre-progenitoras musculares autólogas humanas en dicho medio de cultivo y purificar las células madre-progenitoras musculares autólogas humanas obtenidas.

Las células madre-progenitoras musculares autólogas humanas pueden obtenerse mediante la realización de una biopsia en el propio paciente objeto del posterior implante de tales células madre-progenitoras musculares autólogas humanas, en particular, una biopsia de músculo esquelético.

Estudios previos pusieron de manifiesto que la administración al paciente, anterior a la realización de la biopsia, en la zona de la biopsia, de una composición farmacéutica que comprende un agente farmacológico que estimula la proliferación de las células madre-progenitoras musculares autólogas humanas permite incrementar el número de dichas células al inicio del cultivo. En una realización particular, este preacondicionamiento se realiza mediante la administración al paciente, antes de realizar la biopsia de músculo esquelético, generalmente en un periodo de tiempo comprendido entre 2 días y 15 minutos antes de realizar dicha biopsia, por vía intramuscular, en la zona donde se va a realizar tal biopsia, de una composición farmacéutica que comprende dicho agente farmacológico que estimula la proliferación celular. En una realización particular, dicho agente farmacológico es un anestésico local, tal como lidocaína o bupivacaína, que estimula la proliferación de los mioblastos, lo que se traduce posteriormente en un mayor rendimiento del cultivo celular.

Mediante la biopsia de músculo esquelético se recoge una muestra de tejido muscular que se somete a un tratamiento convencional para digerir las fibras musculares tal como se describe posteriormente con más detalle. La suspensión celular resultante se cultiva en el medio de cultivo autólogo de la invención. En general, la muestra extraída mediante la biopsia muscular contiene distintos tipos de tejidos, tales como adipocitos, fibroblastos, progenitores mesenquimales, células hematopoyéticas, fibras musculares,

- tejido vascular (endotelio, músculo liso) y, obviamente, mioblastos y células satélite. Típicamente, el contenido inicial en células madre-progenitoras musculares autólogas humanas presentes en la muestra de tejido esquelético extraída mediante la biopsia, definidas como CD56+/CD45- es inferior al 10%. Asimismo, existe también un pequeño
- 5 porcentaje de células madre (células satélite) de muy difícil identificación que son las que se reproducen y diferencian hacia células musculares que expresan el antígeno CD56 y que serían progenitores musculares. Como es conocido, el proceso de diferenciación de este tipo celular comprende el paso de célula satélite a mioblasto, luego a miocito inmaduro, a continuación a miocito maduro y, finalmente a miofibra.
- 10 Los progenitores musculares serían los mioblastos y los miocitos (maduros e inmaduros), que pueden ser identificados por la presencia del antígeno CD56, la expresión intracitoplasmática de desmina y la ausencia del antígeno CD45 (es decir, presentan un fenotipo CD56+/desmina+/CD45-). Durante el cultivo celular se produce una proliferación de células satélite y mioblastos que se diferencian hasta, como mucho,
- 15 miocitos. Por tanto, tras la incubación y expansión celular, en el medio de cultivo se acumulan mioblastos y miocitos (maduros e inmaduros) que son utilizados en la elaboración de una composición farmacéutica para inyectar células madre-progenitoras musculares autólogas humanas en el paciente y que, una vez inyectados, terminan su proceso de diferenciación en el propio paciente transformándose en fibras musculares o
- 20 miofibras y desarrollando su función.

La incubación de las células madre-progenitoras musculares autólogas humanas en el medio de cultivo autólogo de la invención se realiza mediante condiciones que permiten la expansión (crecimiento y división) celular.

- La purificación de las células madre-progenitoras musculares autólogas humanas
- 25 obtenidas puede realizarse por cualquier método convencional. En una realización particular, la purificación de dichas células madre-progenitoras musculares autólogas humanas comprende el empleo de anticuerpos específicos y selectivos para dichas células madre-progenitoras musculares autólogas humanas, que permiten la identificación de antígenos extracelulares característicos de dichas células madre-
- 30 progenitoras musculares autólogas humanas, por ejemplo, anticuerpos anti-CD56 humano (CD56 es un antígeno extracelular característico de células de músculo esquelético) en ausencia del antígeno específico de células hematopoyéticas CD45 (es decir, se seleccionan las células que manifiestan un fenotipo CD56+/CD45-).

Ventajosamente, dichos anticuerpos están unidos a microesferas magnéticas para purificar y enriquecer las células madre-progenitoras musculares autólogas humanas mediante un clasificador celular magnético. En otra realización particular, el cultivo celular se somete a un paso previo de pre-siembra (pre-plating) con el fin de sedimentar los fibroblastos antes de proceder a identificar y separar las células madre-progenitoras musculares autólogas humanas. En este caso, la purificación de las células madre-progenitoras musculares autólogas humanas comprende someter al cultivo celular a un paso de pre-siembra con el fin de sedimentar la totalidad o parte de los fibroblastos presentes en dicho cultivo celular y, posteriormente, identificar y separar las células madre-progenitoras musculares autólogas humanas mediante el empleo de anticuerpos anti-CD56 humano, opcionalmente, unidos a microesferas magnéticas, y la selección de las células que manifiestan un fenotipo CD56+/CD45-.

La composición que comprende células madre-progenitoras musculares autólogas humanas obtenible según el método descrito previamente constituye un aspecto adicional de esta invención.

Alternativamente, la invención proporciona un procedimiento para la obtención de células madre-progenitoras musculares autólogas humanas, a partir de una biopsia de tejido de músculo esquelético, para la preparación de una composición farmacéutica, que comprende:

20

a) la realización de una biopsia en un paciente objeto del posterior implante de células madre-progenitoras musculares autólogas humanas para extraer un fragmento de tejido de músculo esquelético que comprende células madre-progenitoras musculares autólogas humanas;

25

b) el cultivo de dichas células madre-progenitoras musculares autólogas humanas procedentes del músculo esquelético en el medio de cultivo autólogo de la invención, bajo condiciones que permiten la expansión de dichas células madre-progenitoras musculares autólogas humanas cultivadas;

30

c) la purificación de dichas células madre-progenitoras musculares autólogas humanas cultivadas; y

- d) la recolección de dichas células madre-progenitoras musculares autólogas humanas purificadas; y, opcionalmente,
- 5 e) la congelación de dichas células madre-progenitoras musculares autólogas humanas purificadas hasta la preparación de dicha composición farmacéutica.

Como se ha mencionado previamente, la administración local al paciente, en un
10 periodo de tiempo comprendido entre 2 días y 15 minutos antes de realizar la biopsia muscular, en la zona de la biopsia, de lidocaína o bupivacaína estimula la proliferación de las células madre-progenitoras musculares autólogas humanas y permite aumentar el número de dichas células al inicio del cultivo.

El cultivo de las células madre-progenitoras musculares autólogas humanas
15 procedentes del músculo esquelético en el medio de cultivo autólogo de la invención, bajo condiciones que permiten la expansión de dichas células madre-progenitoras musculares autólogas humanas cultivadas, incluye la realización de una serie de tratamientos previos convencionales, por ejemplo, lavado, eliminación del tejido adiposo, desmenuzamiento del músculo, disociación enzimática, filtración y recogida de
20 las células mediante, por ejemplo, mediante sedimentación. En general, tras la digestión enzimática de las fibras musculares se obtiene una suspensión celular que contiene gran cantidad de detritus celulares. Tras los pases de cultivo se eliminan los restos de células y fibras y se enriquece en células madre-progenitoras musculares.

La purificación de las células madre-progenitoras musculares autólogas humanas
25 cultivadas persigue, entre otros, el objetivo de obtener composiciones enriquecidas en células madre-progenitoras musculares autólogas humanas sustancialmente exentas de fibroblastos. Para ello, el cultivo celular puede ser sometido a un primer paso de pre-siembra (pre-plating), mediante la que sedimentan los fibroblastos de forma más rápida que los mioblastos o células satélites, y a un proceso posterior de identificación y
30 separación de dichas células madre-progenitoras musculares autólogas mediante cualquier método convencional, por ejemplo, mediante el empleo de anticuerpos específicos y selectivos para dichas células que permiten la identificación de antígenos extracelulares característicos de dichas células madre-progenitoras musculares autólogas

humanas, tal como anticuerpos anti-CD56 humano en ausencia de expresión de CD45. Ventajosamente, dichos anticuerpos están unidos a unas microesferas magnéticas.

Finalmente, las células madre-progenitoras musculares autólogas humanas purificadas se recolectan y, si se desea, en caso de que no vayan a ser utilizadas
5 inmediatamente, se congelan hasta la preparación de dicha composición farmacéutica.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una composición enriquecida en células madre-progenitoras musculares autólogas humanas que comprende una cantidad significativamente elevada de dichas células madre-progenitoras musculares autólogas humanas y un medio de cultivo autólogo de la invención. Como es conocido, la
10 concentración de células madre-progenitoras musculares autólogas humanas en la composición es muy importante ya que si la concentración de dichas células es inferior a un determinado valor, la eficacia de dicha composición disminuye ostensiblemente. Aunque se han descrito en modelos animales composiciones con concentraciones elevadas de células madre-progenitoras, las concentraciones obtenidas con células
15 madre-progenitoras musculares autólogas humanas son, en general, del 50% aproximadamente. Sin embargo, una de las características de la presente invención radica en la posibilidad de obtener composiciones de células madre-progenitoras autólogas humanas con una concentración en dichas células igual o superior al 70%, preferentemente, igual o superior al 80%, más preferentemente, igual o superior al 90%,
20 debido a la posibilidad de enriquecer la composición mediante la purificación de las células madre-progenitoras musculares autólogas humanas, por ejemplo, mediante la inmunopurificación de células CD56+/CD45-. El método de obtención de dicha composición que comprende células madre-progenitoras musculares autólogas humanas, que comprende un tratamiento previo de purificación, permite garantizar que la
25 concentración de células madre-progenitoras musculares en la composición es siempre igual o superior al 70%.

De esta manera, la invención satisface, además, una necesidad demandada por los procedimientos de CMP celular autóloga consistente en obtener niveles muy altos de células madre-progenitoras musculares autólogas humanas (mioblastos y miocitos)
30 evitando la presencia de otros tipos celulares indeseables, por ejemplo, fibroblastos. Dicha composición enriquecida de células madre-progenitoras musculares autólogas humanas puede ser obtenida, tal como se ha mencionado previamente, mediante un primer paso de pre-siembra y un proceso posterior de identificación y separación de

dichas células, que presentan un fenotipo CD56+/CD45-, mediante anticuerpos que específicamente reconocen dichas células madre-progenitoras musculares autólogas humanas, opcionalmente unidos a microesferas magnéticas.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una composición farmacéutica que
5 comprende células madre-progenitoras musculares autólogas humanas, junto con, al menos, un excipiente farmacéuticamente aceptable. En una realización particular, dicha composición farmacéutica es adecuada para su administración por vía parenteral. En principio, cualquier excipiente farmacéuticamente aceptable capaz de vehiculizar las células madre-progenitoras musculares autólogas humanas puede ser utilizado en la
10 presente invención. En una realización particular, dicha composición farmacéutica comprende albúmina que se utiliza como excipiente para resuspender las células madre-progenitoras musculares autólogas humanas.

Tal como se utiliza en la presente invención el término "composición farmacéutica" se refiere a una composición de células madre-progenitoras musculares autólogas preparada para su uso terapéutico en un implante celular, que comprende, al
15 menos, 20 millones de células, con una densidad celular de, al menos, 50 millones de células/ml y, al menos, 40% de células madre-progenitoras autólogas CD56+/CD45-, medio de cultivo autólogo de la invención, y, al menos, un excipiente farmacéuticamente aceptable. En una realización particular, dicha composición farmacéutica comprende
20 entre 20 y 200 millones de células, con una densidad celular comprendida entre 50 y 70 millones de células/ml y, al menos 70% de células madre-progenitoras autólogas CD56+/CD45-, medio de cultivo autólogo de la invención, y, albúmina humana en una cantidad comprendida entre 0,1% y 20% en peso respecto al total.

Las células madre-progenitoras musculares autólogas humanas, obtenidas según
25 el procedimiento previamente descrito, así como las composiciones farmacéuticas que las contienen, pueden utilizarse en la elaboración de una composición farmacéutica:

para la reparación y/o reconstitución de tejido muscular cardíaco, y/o
para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca post-isquémica, y/o
para el tratamiento de la miocardiopatía dilatada y/o
30 para el tratamiento de cardiomiopatía no isquémica.

6. Procedimiento terapéutico

En otro aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento terapéutico de CMP celular autóloga para crear, regenerar y reparar tejido miocárdico disfuncional mediante el implante de una composición farmacéutica que comprende células madre-progenitoras musculares autólogas humanas, debido a su capacidad de regenerar tejido cardíaco, expandidas y mantenidas *ex vivo* en un medio de cultivo autólogo; comprendiendo dicho procedimiento recoger una muestra de material procedente del cuerpo del paciente objeto del implante posterior que comprende células madre-progenitoras musculares autólogas humanas, expandir dichas células mediante cultivo en un medio de cultivo autólogo proporcionado por esta invención e implantar las células madre-progenitoras autólogas humanas recolectadas en el paciente al que previamente se le había extraído dicho material conteniendo las células madre-progenitoras musculares autólogas.

De forma más concreta, la invención proporciona un procedimiento terapéutico de CMP celular autóloga para crear, regenerar y reparar tejido miocárdico disfuncional mediante el implante de una composición farmacéutica que comprende células madre-progenitoras musculares autólogas humanas, regeneradoras de tejido cardíaco, expandidas y mantenidas *ex vivo* en un medio de cultivo autólogo; y donde dicho procedimiento comprende los siguientes pasos:

- a) la toma al paciente de una biopsia de músculo esquelético tomada de un músculo, preferentemente, preacondicionado mediante una inyección intramuscular de un anestésico local, tal como lidocaína o bupivacaína;
- b) la preparación de un medio de cultivo de las células madre-progenitoras autólogas humanas a partir de suero autólogo del paciente;
- c) la preparación de una composición enriquecida de células madre-progenitoras musculares autólogas a partir de la biopsia de a) y del medio de cultivo de b);
- d) la preparación de una composición farmacéutica a partir de la composición de c); y

- e) el implante de la composición farmacéutica de células madre-progenitoras autólogas de d) en lesiones miocárdicas.

Las células madre-progenitoras musculares autólogas humanas comprenden
5 mioblastos y miocitos (maduros e inmaduros) y tienen la capacidad de regenerar tejido cardíaco cuando se implantan en el músculo cardíaco.

Tal como se utiliza en la presente descripción el término "lesiones miocárdicas" hace referencia tanto a cardiomiopatías isquémicas como idiopáticas. En una aplicación particular, el procedimiento de CMP celular autóloga según la presente invención se
10 aplica a pacientes con una cardiomiopatía isquémica debida a un infarto de miocardio sin posibilidad de revascularización quirúrgica o percutánea, así como a pacientes subsidiarios de revascularización cardíaca. El objetivo de esta CMP celular autóloga sería limitar la expansión del infarto, el remodelado cardíaco y la regeneración del miocardio. La definición de cardiomiopatía isquémica incluye a los pacientes con infarto
15 del ventrículo derecho o del ventrículo izquierdo, en este último caso con posibilidad de regurgitación isquémica de la válvula mitral. En otra aplicación particular, el procedimiento de CMP celular autóloga según la presente invención se aplica a pacientes con una cardiomiopatía idiopática dilatada.

Entre los beneficios de la CMP celular se pueden citar la disminución de fibrosis,
20 la reducción del área de la cicatriz del infarto y la mejora de la elasticidad y propiedades de la pared ventricular (esenciales para restablecer la función diastólica).

En una realización particular, el implante de la composición farmacéutica de células madre-progenitoras autólogas de d) en lesiones miocárdicas se realiza mediante inyección directa. El término "implante mediante inyección directa" tal como se utiliza
25 en la presente invención hace referencia a una administración epicárdica o endovascular de la composición farmacéutica proporcionada por esta invención en pacientes con cardiomiopatías isquémicas o idiopáticas. En una realización particular, se realiza una administración epicárdica o endovascular de la composición farmacéutica de la invención en pacientes con cardiomiopatía isquémica distribuida de la siguiente forma:
30 un 70% aproximadamente en el área periférica al infarto y un 30% aproximadamente en la parte central de la cicatriz. La administración epicárdica puede realizarse bien por exposición quirúrgica convencional o bien por toracoscopia. En la aproximación quirúrgica (toraco/esternotomía clásica o mini) el área isquémica queda bien expuesta

permitiendo realizar las inyecciones de la composición terapéutica en la zona infartada y, mayoritariamente, en la zona que la circunda. La inyección de la composición farmacéutica conteniendo células madre-progenitoras musculares autólogas humanas proporcionada por esta invención también puede realizarse en la zona perilesional. Con esta distribución del implante propugnada en la presente invención se consigue una mayor supervivencia de las células implantadas en la región periférica por la irrigación residual y la revascularización miocárdica colateral existente y se evita en parte la elevada mortalidad celular que se observa en los implantes que se realizan en la cicatriz isquémica altamente fibrótica.

En otra realización particular, el implante de la composición farmacéutica de células madre-progenitoras autólogas de d) en lesiones miocárdicas se realiza mediante administración sistémica o intracoronaria a través de un acceso venoso percutáneo.

En otra realización particular, el procedimiento de CMP celular autóloga según la presente invención se aplica a pacientes con una cardiomiopatía idiopática dilatada realizándose múltiples implantes de la composición farmacéutica proporcionada por la invención entre las arterias coronarias en el miocardio de los dos ventrículos.

En la actualidad se dispone de nuevos sistemas quirúrgicos computerizados para su uso en cirugía cardíaca. La realización de puentes o bypass coronarios asistidos robóticamente mediante acceso torácico se está incrementando ya que permite una recuperación del paciente rápida y segura con un reducido riesgo de infecciones y un excelente resultado cosmético. En una realización particular, el implante se realiza mediante inyección directa transepicárdica utilizando el mencionado sistema robotizado computerizado. En una realización concreta la aguja se inserta en el miocardio mediante un brazo de robot controlado mediante vídeo, la jeringa se localiza fuera del tórax y se conecta con la aguja mediante un tubo extensor de pequeño diámetro. La ventaja de esta aproximación en pacientes con insuficiencia cardíaca es que el procedimiento terapéutico de CMP celular autóloga puede realizarse de forma segura sin manipulaciones del corazón, evitando el riesgo de alteración hemodinámica y fibrilación ventricular.

El efecto beneficioso de la CMP celular podría estar limitado por la tasa de mortalidad de las células inyectadas. Para resolver este problema, la invención propone realizar inyecciones periódicas mediante procedimientos de implante percutáneo o quirúrgicos de las células madre-progenitoras autólogas de la presente invención. Esta

aproximación permitiría lograr el objetivo de la CMP, reduciendo progresivamente las áreas infartadas o mejorando el miocardio patológico. Con este fin la invención incluye la creación de un banco personalizado de cada paciente de células madre-progenitoras autólogas, originado a partir de células aisladas y congeladas durante el procedimiento de cultivo celular de cada individuo. A partir de las células madre-progenitoras autólogas almacenadas pueden expandirse nuevos cultivos celulares para la preparación de nuevas composiciones evitando nuevas biopsias o eliminación de tejidos.

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la invención y no deben ser considerados en sentido limitativo de la misma.

10

EJEMPLO 1

En este ejemplo se describe la obtención y manipulación de células madre-progenitoras musculares autólogas humanas para su empleo en un procedimiento de CMP celular autóloga con el fin de revertir el tejido miocárdico disfuncional dañado en una estructura histológica viva capaz de generar presión sistólica y diastólica.

15

1.1 Biopsia de músculo esquelético

Un día antes de proceder a realizar la biopsia quirúrgica se inyectó al paciente, por vía intramuscular, una solución al 2% de lidocaína, en y alrededor del músculo del vasto lateral. La biopsia se realiza mediante una incisión de 5 cm en el vasto lateral, y, en condiciones estériles, se extrae un fragmento de 2 a 3 cm³ de músculo esquelético (unos 15 g). Inmediatamente después se fragmenta el tejido muscular extraído con unas tijeras, se introduce en medio de cultivo completo o en una solución de tampón fosfato (PBS) y se mantiene a 4°C. El procedimiento para el aislamiento y purificación celular y su cultivo se debe comenzar lo antes posibles para garantizar la supervivencia celular. Las muestras se transportan al laboratorio de Biología Celular en un contenedor apropiado y a baja temperatura.

20

25

1.2 Preparación del medio de cultivo autólogo

30

A partir de muestras de sangre

En un Centro de Transfusión de Sangre, se recoge sangre venosa del paciente. Mediante venipuntura se rellenan 50 tubos de 10 ml para recogida de suero. Después de la sedimentación celular y precipitación de la fibrina, bajo cabina de flujo laminar se

extrae el suero de cada tubo y se recoge en una bolsa de sangre vacía. Se toman muestras de suero para ensayos hematológicos y microbiológicos (bacterias y virus). La bolsa con el suero se congela a -80°C a la espera de recibir los resultados de los ensayos hematológicos y microbiológicos.

- 5 Antes de preparar el medio de cultivo se inactiva el complemento del suero a 56°C durante 1 hora y se filtra. Parte del suero se combina con el medio de cultivo y se mantiene a 4°C , se calienta hasta 37°C y se filtra antes de añadir al frasco con el cultivo celular. El medio de cultivo final contiene un 10% de suero humano autólogo del paciente, 89% de medio HAM-F12 (GIBCO BRL, Cat. No. 21765), 1% de
10 penicilina/estreptomicina, heparina (2 UI/ml de suero obtenido), protamina (en forma de sulfato) (3 UI por ml de suero obtenido) y, opcionalmente, anfotericina B (0,25 mg/ml) y/o de 0,1 a 250 pg/ml de bFGF recombinante.

- El suero humano restante se congela a -40°C a la espera de una nueva
preparación de medio de cultivo. En cada preparación de medio se inactiva nuevamente
15 el complemento a 56°C durante 1 hora con filtrado posterior.

A partir de plasmaféresis

- Inmediatamente antes de iniciar el procedimiento de plasmaféresis se administra al paciente una dosis de 50 UI/kg de heparina sódica no fraccionada. El proceso de
20 plasmaféresis se realiza según el procedimiento de rutina previsto para el equipo empleado. Durante la plasmaféresis el anticoagulante estándar es sustituido por una solución fisiológica de cloruro sódico 0,9% con heparina como anticoagulante. El plasma se sustituye por albúmina al 5%. El procedimiento se termina una vez obtenido el volumen de plasma necesario para la preparación del medio de cultivo autólogo. Se
25 calcula la cantidad de heparina en el plasma obtenido en función del volumen plasmático del paciente y se añade 1,5 UI de protamina por cada UI de heparina. Se mantiene así hasta que se produce la coagulación del plasma. Entonces se extrae el suero y se distribuye en pequeñas alícuotas que se congelan. Al igual que para el suero obtenido de
muestras sanguíneas, también en este caso las muestras de suero se analizaron
30 hematológica y microbiológicamente antes de ser utilizadas.

1.3 Aislamiento de las células satélite y expansión *in vitro*

Todas las manipulaciones se realizan en condiciones asépticas y utilizando una cabina de flujo laminar. Los fragmentos de músculo esquelético explantado se lavan con PBS. Con unas tijeras se elimina el tejido adiposo y con cuidado se desmenuza el músculo. Los fragmentos de músculo se lavan nuevamente con PBS hasta que el sobrenadante aparezca limpio. Se centrifuga durante 5 minutos a 100g. El tejido se disocia mediante 2 tratamientos enzimáticos consecutivos: primero las células se incuban con colagenasa IA (1,5 mg/ml/g de tejido) y se dejan incubando durante 1 hora. Cada 10 minutos se agitan los tubos para favorecer mecánicamente la disociación. Alternativamente, los tubos pueden colocarse en un incubador con agitación recíprocante/orbital (ROSI) a 37°C. En segundo lugar se incuba durante 20 minutos con un 0,25% de tripsina 1 x EDTA (2 ml). A continuación se lavan las células (10 minutos a 300g) y para detener la reacción enzimática se añade 1 ml del propio suero del paciente obtenido previamente. Se realiza una filtración a través de una malla 40 µm (cell stainer nylon). Con los fragmentos que hayan podido quedar en la malla se repite nuevamente el procedimiento de digestión. Finalmente las células del filtrado se recogen por sedimentación (20 minutos a 300g) y el sobrenadante se desecha.

Las células se resuspenden en medio de cultivo completo fresco: 10% de suero humano autólogo del paciente, 89% de medio HAM-F12 (GIBCO BRL, Cat. No. 21765), 1% de penicilina/estreptomicina y, opcionalmente, anfotericina B (0,25 mg/ml), que contiene, además, heparina (2 UI/ml de suero obtenido) y protamina (en forma de sulfato) (3 UI por ml de suero obtenido), y se siembran en frascos para cultivo celular. A continuación, los frascos se incuban durante 3 semanas a 37°C en una atmósfera húmeda y con 5% de CO₂. Los frascos se colocan en el incubador sin gradiente de nivel para evitar una proliferación celular irregular. Después de un periodo de incubación de 2 a 3 días se renueva en el medio para eliminar las células sanguíneas y las células muertas. Cuando se llega a la sub-confluencia (50% de confluencia) se realiza un paso de los cultivos (fracción 1:5) para evitar la aparición de diferenciación miogénica a mayores densidades. A confluencias del 50% se requerirán múltiples pasos del cultivo para prevenir que las células mononucleadas se diferencien en miotubos multinucleados.

En cada paso de los cultivos, las células se cosechan por tripsinización (2 ml de 0,25% tripsina-EDTA en cada frasco durante 1 a 5 minutos en el incubador). El desprendimiento completo de las células se comprueba observando al microscopio las

células que flotan. Entonces se detiene la reacción mediante adición de medio de cultivo completo y la suspensión de células resultante se reparte en otros 5 frascos. En cada paso del proceso de cultivo celular se realizan controles para bacterias (ensayos de aerobios y anaerobios), virus y hongos.

5

1.4 Eliminación de fibroblastos

Normalmente los fibroblastos contaminan los cultivos por lo que es necesario eliminarlos para obtener una expansión de mioblastos adecuada. En el momento de realizar el primer pase, y, después de neutralizar con tripsina, las células cultivadas se mantienen en el incubador durante 30 minutos. Este periodo de tiempo es suficiente para que los fibroblastos sedimenten mientras que la mayoría de los mioblastos (más pequeños) permanecen en suspensión. Se recoge el sobrenadante celular y se transfiere a nuevos frascos de cultivo. La pureza de las células mioblásticas se valora por citometría de flujo con un anticuerpo anti-CD56 humano y tinción de desmina intracelular. Las muestras con una pureza de mioblastos inferior al 50% se someten a un procedimiento de enriquecimiento celular. Para ello, en el momento del segundo pase, después de cosechar las células y antes de sembrarlas, éstas se marcan con un anticuerpo de ratón anti-CD56 humano al que se han unido unas microesferas magnéticas. Mediante una selección positiva realizada con un clasificador celular magnético se tienen poblaciones celulares altamente enriquecidas de mioblastos progenitores de células musculares que expresan CD56 y desmina en más del 90% de las células.

Habitualmente, para obtener la cantidad final de células necesaria se deben realizar varios pases. En general, al cabo de unas 3 semanas, se obtienen más de 200 millones de células. Este número puede escalararse mediante pases en un sistema de cultivo multicadena.

25

1.5 Aislamiento de células para el banco personalizado

Para cada paciente, durante el proceso de cultivo celular pueden aislarse algunas células que serían congeladas. A partir de esas células almacenadas pueden expandirse nuevos cultivos celulares, para realizar inyecciones intramiocárdicas repetidas periódicas (evitando así el tener que repetir nuevas biopsias). En el momento del segundo pase, algunas muestras de células positivas para CD56 altamente enriquecidas se criopreservan utilizando 5% de DMSO, se someten a una congelación programada y

30

finalmente se almacenan en nitrógeno líquido. La concentración celular será de 25 a 50 millones de células por ml. Cuando sea necesario, las células se descongelan y se cultivan en medio de mioblastos para su posterior utilización (implante percutáneo) una vez se haya realizado la expansión *ex vivo*.

5

1.6 Medio de inyección

El día del trasplante celular, se cosechan las células y se lavan en medio de inyección (albúmina humana 0,5% y medio de cultivo completo) y se mantienen en hielo antes del implante. Por citometría de flujo se valora la tasa final de pureza de los mioblastos. Mediante un citómetro de Malassez (mediante tinción con tripán blue) se determina la concentración celular y su viabilidad. Asimismo, antes del implante, se valora la esterilidad del cultivo celular (test de Gram).

10

1.7 Procedimiento de implante celular

El implante celular puede realizarse mediante una administración epicárdica o endovascular. La administración epicárdica puede realizarse bien por exposición quirúrgica convencional o bien por toracoscopia. En la aproximación quirúrgica (toraco/esternotomía clásica o mini) el área isquémica queda bien expuesta permitiendo realizar alrededor de 10 inyecciones de suspensión celular en la zona infartada y mayoritariamente en la zona que la circunda. Para este propósito se utiliza una aguja curvada de 23 a 26 G x 4 cm. La densidad celular recomendada está comprendida entre 50 y 70 millones de células/ml. La inyección se realiza lentamente, durante aproximadamente 15 minutos. Después de cada inyección los orificios de la aguja deberán bloquearse mediante presión dactilar (1 a 2 minutos) para evitar que haya una regurgitación de la suspensión celular.

15

20

25

Protocolo de implante de los mioblastos:

- implante de, al menos, 20 millones de células, preferentemente, unos 200 millones de células
- densidad celular: 50 a 70 millones de células por ml
- tiempo de cultivo: aproximadamente 21 días
- concentración de mioblastos: superior a 70%
- vida media celular a 2-8°C: 96 horas.

30

EJEMPLO 2

Este ejemplo es un estudio clínico en fase I/II realizado para valorar la idoneidad y seguridad del trasplante intramiocárdico de una composición de células madre-progenitoras musculares autólogas humanas de la invención a pacientes que han padecido infarto de miocardio.

MATERIAL Y METODOS

2.1. Selección de pacientes

El estudio se realizó sobre un total de 12 pacientes que habían padecido previamente un infarto de miocardio, al menos 4 semanas antes de su inclusión en el protocolo, y que estaban en espera de someterse a un bypass aortocoronario. Para la selección de los pacientes se tuvo en cuenta la edad (comprendida en el rango 30-80 años), la función cardíaca (fracción de eyección ventricular izquierda superior al 25%) y que no tuvieran historia de arritmias malignas o distrofias musculares, ni dieran resultado positivo en las pruebas de disfunción hepática o nefrítica o en pruebas de embarazo, HIV o hepatitis.

2.2. Biopsia muscular, cultivo y caracterización de las células madre-progenitoras musculares autólogas humanas

La preparación de las células madre-progenitoras musculares autólogas humanas para la composición terapéutica se realizó tal y como se describe en el Ejemplo 1.

Las biopsias musculares se obtuvieron del vasto lateral en condiciones estériles y después de un preacondicionamiento con 2% lidocaína hidrocloreuro. En todo el procedimiento se utilizó un medio de cultivo autólogo humano de la invención que comprendía un 79% de medio HAM-F12 (GIBCO-BRL) suplementado con un 20% de suero autólogo del paciente (con heparina y protamina) y un 1% de penicilina/estreptomicina (GIBCO-BRL). El suero autólogo del paciente se obtuvo mediante plasmaféresis, tal y como se describe en el apartado 1.2 del ejemplo anterior, realizada el día anterior a la obtención de la biopsia muscular (entre 800 y 2.135 mL por paciente, promedio: 1.735 mL).

Para el aislamiento de las células satélite las digestiones enzimáticas se realizaron mediante incubación con tripsina/EDTA (0,5 mg/mL tripsina y 0,53 mM EDTA,

GIBCO-BRL) y posteriormente con colagenasa (0,5 mg/mL, GIBCO-BRL). El procedimiento de expansión celular y eliminación de fibroblastos se realizó como se ha descrito en el ejemplo anterior. La pureza de células mioblásticas en los cosechados se valoró por citometría de flujo y tinción con anticuerpos monoclonales específicos para N-CAM humana (CD56), CD45 y desmina.

El promedio de células miogénicas obtenidas por paciente fue 221×10^6 (siempre dentro del rango $105-390 \times 10^6$), y la pureza media de células miogénicas CD56+/CD45- fue $65,6 \pm 6,4\%$.

2.3 Trasplante celular

Antes del procedimiento quirúrgico, para cada paciente se determinó la función y viabilidad del músculo cardíaco mediante tomografía de emisión de positrones (PET), ecocardiograma y electrocardiograma (Holter-EGC 24 horas). El bypass aortocoronario con circulación extracorpórea se realizó entre 3 y 4 semanas después de haber realizado la biopsia muscular. Los pacientes recibieron una media de 2 injertos (entre 1 y 4).

Una vez suturados todos los injertos y reestablecido el latido espontáneo del corazón se procedió al implante celular por administración epicárdica mediante al menos 10 inyecciones repetidas en la zona infartada y áreas circundantes, zonas que ecocardiográficamente habían sido identificadas como hipokinéticas, akinéticas o diskinéticas. Para las inyecciones se utilizó una cánula oftálmica 23G (Maersk Medical Ltd, Redditch, B98 9NL GB). Las zonas que iban a recibir el implante celular fueron identificadas mediante ecocardiograma antes del procedimiento quirúrgico con el objetivo de poder evaluar la contractilidad de dichas zonas durante el seguimiento posterior al trasplante celular.

Después del procedimiento quirúrgico los pacientes fueron sometidos a una monitorización telemétrica continua. Cada 6 horas se tomaron muestras de sangre para valorar presencia de enzimas necróticas cardíacas. Para prevenir la inflamación se administró metil-prednisolona (500 mg) después de la cirugía. Para prevenir arritmias cardíacas se indicó un tratamiento de 3 meses con amiodarona oral. Para la monitorización de la respuesta al procedimiento de cardiomioplastia realizado se efectuó un seguimiento mediante PET (3 meses después del trasplante), ecocardiograma (a los 40 días y a los 3 meses después del trasplante). Igualmente se monitorizó la presencia de arritmias mediante Holter-ECG (40 días y 3 meses después del trasplante).

El protocolo y todos los procedimientos realizados fueron previamente aprobados por los comités éticos de ensayos clínicos, institucional y regional, de acuerdo con los requerimientos legalmente previstos.

5 Estudios ecocardiográficos. La contractilidad miocárdica global y regional se midió por ecocardiografía bidimensional (mediante un sistema ultrasonidos Sonos 5500, Philips). El análisis del movimiento de la pared ventricular izquierda regional se realizó conforme al procedimiento descrito por el comité de estándares de la Sociedad Americana de Ecocardiografía (Schiller NB et al. *J. Am. Soc. Echocardiogr.* 1989; 2: 10 358-367): el ventrículo izquierdo se dividió en 16 segmentos y se valoró para cada segmento el movimiento de la pared como 1=normal, 2=hipokinesia, 3=akinesia, 4=diskinesia. El índice de motilidad regional (wall motion score index, WMSI) se calculó como la suma de los índices de cada segmento dividida por el número de segmentos evaluados. Se obtuvo un índice WMSI para los segmentos tratados con 15 implante celular y otro para los no tratados. La fracción de eyección del ventrículo izquierdo (LVEF) se obtuvo mediante un sistema de detección automática del borde endocárdico (automatic border detection, ABD) (Perez JE et al. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1992; 19: 336-344). También se valoró la contractilidad regional de cada segmento mediante colorkinesis y doppler tisular. Las valoraciones se realizaron por un 20 procedimiento de doble ciego (2 observadores independientes sin información previa). La reproducibilidad dentro del estudio para el volumen diastólico final en el ventrículo izquierdo fue $2,8 \pm 6,4$ (CV 5,5%) y para la fracción de eyección (LVEF) $0,3 \pm 4,6$ (CV 6,6%).

25 Estudios de tomografía por emisión de positrones (PET). Mediante PET se valoró el flujo sanguíneo miocárdico, y el metabolismo de glucosa, antes del tratamiento quirúrgico y a los 3 meses del trasplante celular.

Los estudios de perfusión y metabolismo se realizaron en un tomógrafo PET (ECAT EXACT HR+, Siemens/CTI Knoxville, EE.UU) que adquiere 63 planos 30 transaxiales con una resolución espacial entre planos de 4,5 mm. La producción de los trazadores, para los estudios de metabolismo de glucosa (^{18}F -FDG) y para los de perfusión (^{13}N -amonio), se realizó en el ciclotrón (Cyclone 18/9, Ion Beam Applications, Bélgica) y en el laboratorio de radiofarmacia del centro.

El protocolo de adquisición de imágenes en cada paciente se inició con un estudio de transmisión de 2 minutos utilizando fuentes de germanio-68 para posicionar el corazón en el campo de visión, seguido de una adquisición de 5 minutos para efectuar la corrección de atenuación fotónica. Seguidamente se perfundió ^{13}N -amonio (9,25 MBq/kg, máximo 740 MBq) mediante inyección intravenosa a un flujo constante de 10 ml/min. La adquisición dinámica de imágenes se inició en el momento de la inyección. Durante 20 minutos se recogieron imágenes seriadas en una secuencia dinámica con esquema de duración variable: 12 x 10 s, 4 x 10 s, 4 x 30 s, 3 x 300 s. La adquisición de datos del PET se realizó de acuerdo a un protocolo ya descrito en la bibliografía (Muzik O et al. *J. Nucl. Med.* 1993; 34: 336-344). Una vez obtenidas las imágenes para la valoración de la perfusión se reservó un periodo de 50 minutos para permitir el decaimiento físico de la radiactividad del ^{13}N -amonio (semiperíodo de desintegración 9,9 minutos). Posteriormente se inició la adquisición de imágenes para los estudios metabólicos de glucosa, realizados siguiendo la técnica de clampaje hiperinsulinémico-euglicémico (Knuuti MJ et al. *J. Nucl. Med.* 1992; 33: 1255-1262). La ^{18}F -FDG se inyectó mediante bolo intravenoso después de estabilizar los niveles de glucosa en un rango comprendido entre 85 y 95 mg/dl (4,6 MBq/kg, máximo 370 MBq). La adquisición de las imágenes seriadas de la ^{18}F -FDG se inició en el momento de la inyección y se prolongó durante 60 minutos (8 x 15 s, 2 x 30 s, 2 x 120 s, 1 x 180 s, 4 x 300 s, 3 x 600 s), siguiendo el protocolo descrito por Knuuti y colaboradores citado *supra*.

Finalizada la adquisición de las imágenes se realizó una segmentación de la transmisión previa a la reconstrucción para la corrección de atenuación. Las imágenes del estudio metabólico se reconstruyeron utilizando el procedimiento OSEM (ordered subsets expectation maximisation) con 2 iteraciones y 8 subconjuntos. A todos los estudios (tanto para perfusión como para metabolismo) se les aplicó un filtro gaussiano (Gaussian smoothing filter) de 6 mm FWHM (full width at half maximum). Para el análisis visual las imágenes transaxiales se reorientaron según el eje corto, el eje largo vertical y el eje largo horizontal del ventrículo izquierdo.

Finalmente, para el análisis cuantitativo se utilizaron 6 secciones contiguas de la región media del ventrículo izquierdo, en el eje corto. El flujo sanguíneo miocárdico regional (myocardial blood flow, MBF) se calculó en valores absolutos según un modelo de 3 compartimentos (Muzik O et al. *J. Nucl. Med.* 1993; 34: 83-91), y los valores de utilización de glucosa (myocardial glucose utilization rates, rMGU) se estimaron

mediante el análisis gráfico de Patlak (Patlak CS et al. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1985; 5: 584-590).

5 RESULTADOS

2.4 Trasplante celular y evolución postquirúrgica

Las características demográficas, clínicas y funcionales de los pacientes en el estudio se recogen en las siguientes Tablas 1 y 2.

10

Tabla 1

Características de los pacientes

| | Caso | Edad | Sexo | Local | Evol. | Síntomas | Clas. NYHA | Local |
|----|------|------|------|-----------------|---------|---------------|------------|-----------------|
| | | | | Infarto | Infarto | Angina/disnea | Basal/FU | Bypass |
| | | | | | (meses) | | | |
| 15 | 1 | 63 | H | Anterior | 4 | Inestable/III | III/II | LAD, RC, OM |
| | 2 | 64 | H | Anterior-apical | 6 | III/II | II/I | LAD, OM |
| | 3 | 40 | H | Inferior | 5 | Inestable/II | II/I | RC, LAD |
| | 4 | 55 | H | Anterior | 23 | I/I | II/I | LAD, RC, OM |
| | 5 | 68 | H | Anterior-apical | 168 | III/III | III/II | LAD, RC, OM |
| 20 | 6 | 74 | M | Anterior | 10 | /III | III/III | LAD |
| | 7 | 69 | H | Inferior | 125 | Inestable/II | II/ | LAD, RC, OM, Dg |
| | 8 | 71 | H | Inferior | 108 | Inestable/II | II/I | LAD, OM |
| | 9 | 56 | H | Anterior | 120 | III/ | I/I | LAD, Dg, OM |
| | 10 | 74 | H | Inferior | 20 | III/II | II/ | LAD, OM, Dg, RC |
| 25 | 11 | 68 | H | Anterior | 3 | I/I | I/I | LAD, RC, OM |
| | 12 | 73 | H | Anterior-apical | 146 | III/III | III/II | LAD, Dg, OM |

Abreviaturas:

Sexo. H: hombre; M: mujer

30

Clasificación NYHA: Clasificación de la "New York Heart Association".

FU: Evaluación de seguimiento realizada 3 meses después de la cirugía y trasplante celular.

Localización de los Bypass. LAD: arteria descendente anterior izquierda; RC: arteria coronaria derecha; M: arteria obtusa marginal; Dg: arteria coronaria diagonal.

- 5 Durante la realización del bypass aortocoronario, una vez finalizados los injertos y restaurado el latido espontáneo del corazón, se visualizó el área infartada y se inyectaron entre 3 y 5 ml de solución conteniendo las células miogénicas a una concentración siempre superior a 20×10^6 células/ml. Las áreas de inyección se identificaron para el seguimiento ecocardiográfico. Antes de proceder al trasplante e
- 10 inmediatamente después de recolectar las células para dicho trasplante se realizaron cultivos microbiológicos para prevenir contaminaciones. Por este motivo no se realizó el trasplante al paciente 9, cuyas muestras celulares dieron positivo en la tinción de gram. No obstante, a este paciente también se le realizaron los estudios protocolizados para el seguimiento.

Tabla 2

Datos sobre los trasplantes celulares realizados

| Caso | Biopsia muscular (g) | Cel. Miogénicas implantadas (x10 ⁶) | LVEF basal 2D/ABD | LVEF FU 2D/ABD |
|------|-------------------------|---|----------------------|-------------------|
| 5 | | | | |
| 1 | 10 | 318 | 35/37 | 55/56 |
| 2 | 13 | 165 | 40/45 | 50/53 |
| 3 | 7,5 | 192 | 45/46 | 70/65 |
| 4 | 7 | 393 | 40/47 | 62/66 |
| 10 | | | | |
| 5 | 10 | 200 | 27/26 | 40/50 |
| 6 | 9 | 110 | 30/38 | 40/48 |
| 7 | 9,5 | 171 | 40/38 | No FU |
| 8 | 5,5 | 105 | 40/42 | 47/51 |
| 9 | 9 | 0 | 45/40 | 35/38 |
| 15 | | | | |
| 10 | 14 | 390 | 25/29 | No FU |
| 11 | 10 | 100 | 40/43 | 51/49 |
| 12 | 11,3 | 180 | 43/41 | 46/45 |

Abreviaturas:

20 LVEF: Fracción eyección ventricular izquierda

FU: Evaluación de seguimiento realizada 3 meses después de la cirugía y trasplante celular.

2D: bidimensional; ABD: detección automática del borde endocárdico.

25 En la evolución postquirúrgica de los pacientes trasplantados no se produjeron complicaciones. Dado que en ensayos clínicos previos se observaron arritmias cardíacas, posiblemente asociadas al trasplante de células miogénicas esqueléticas, se monitorizó a los pacientes durante su hospitalización (mediante telemetría continua) y a los 40 días y 3 meses desde el trasplante (mediante un holter-ECG, 24 horas). En ningún caso se observó un incremento significativo de arritmias. Es más, el número de latidos ventriculares prematuros se redujo después del trasplante. Sin embargo, el paciente 6 desarrolló una taquicardia ventricular no sostenida 40 días después de la cirugía. Este

30

paciente fue sometido a aneurisectomía durante el procedimiento quirúrgico, lo que podría explicar el suceso.

Los análisis serológicos de enzimas cardíacas y hepáticas no mostraron cambios significativos después del trasplante y regresaron progresivamente a sus valores normales. Como medida indirecta de inflamación se determinó la proteína C, sin que se observaran cambios significativos después del trasplante o durante el seguimiento.

Todos los pacientes han abandonado el hospital y continúan vivos.

2.5 Función del ventrículo izquierdo

El incremento medio de la fracción de eyección del ventrículo izquierdo, medida por ecocardiografía bidimensional, se incrementó desde el $35,5 \pm 2,3\%$ (media \pm error medio estándar) antes de la cirugía hasta un $53,5 \pm 4,98\%$ a los 3 meses del trasplante ($p < 0,05$). La contractilidad cardíaca global, estimada mediante ecocardiografía automática de detección del borde endocárdico (ABD), se incrementó desde un $39,8 \pm 3,26\%$ hasta un $56,3 \pm 3,1\%$ ($p < 0,05$) (Figura 1).

También se produjo una mejora de la contractilidad local, evidenciada por la reducción del número medio de segmentos akinéticos/hipokinéticos/diskinéticos de 7 (entre 5-10, antes de la cirugía) a 3 (entre 0-5, a los 3 meses del trasplante).

El índice de motilidad regional WMSI basal, promedio $1,72 \pm 0,14$, se redujo a los 3 meses del trasplante, $1,25 \pm 0,07$ ($p < 0,05$) (Tabla 3). Para diferenciar los beneficios potenciales sobre la función cardíaca que se derivan del trasplante de células miogénicas de los derivados de la revascularización compararon las mejoras en los índices WMSI de los segmentos que recibieron trasplante celular y los de los segmentos que no recibieron células. Los WMSI a los 3 meses se redujeron significativamente frente a los índices basales (antes de la cirugía), con una mayor reducción en los segmentos que recibieron trasplante celular (Tabla 3).

El descenso de WMSI está asociado con una mejora en la clasificación NYHA, de un $2,2 \pm 0,2$ basal a $1,5 \pm 0,26$ a los 3 meses ($p < 0,01$).

Tabla 3

Función regional (medida por el índice WMSI, Wall motion score index)

| | Basal | 40 días | 3 meses | p |
|-----------------------|-----------|-----------|-----------|-------|
| Global | 1,73±0,07 | 1,40±0,07 | 1,25±0,07 | 0,027 |
| 5 Segmentos tratados | 2,64±0,13 | 2,03±0,16 | 1,64±0,16 | 0,027 |
| Segmentos no tratados | 1,29±0,13 | 1,1±0,06 | 1,05±0,04 | 0,043 |

2.6 Perfusión miocárdica y estudios de viabilidad

- 10 En 7 pacientes se realizaron estudios de perfusión (PET-amonio) y metabólicos (FDG-glucosa), mediante pruebas realizadas antes de la cirugía (1 a 5 días antes) y 3 meses después del trasplante. Para cada región se calculó la retención de trazador asignándole un valor numérico cuantitativo. La retención media de glucosa para todo el miocardio antes de la cirugía fue $0,158 \pm 0,026 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ mientras que a los 3 meses
- 15 fue $0,270 \pm 0,008 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ($p < 0,05$). Al analizar diferencialmente las áreas infartadas (tejido necrótico debido al infarto de miocardio) se comprobó un aumento significativo de la retención de amonio y de glucosa, lo que sugiere una mejoría de la viabilidad miocárdica en las zonas infartadas (Tabla 4). Véase también la Figura 2.

Tabla 4

20 Tomografía de emisión de positrones PET. Valoración del flujo sanguíneo mediante retención de ^{13}N -amonio ($\text{ml} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$), y del metabolismo de glucosa mediante retención de ^{18}F -FDG ($\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)

| | | | Basal | 3 meses | p |
|----|------------------------|------------------------|-------------|-------------|-------|
| 25 | Global | ¹⁸ F-FDG | 0,158±0,026 | 0,270±0,008 | 0,028 |
| | | ¹³ N-amonio | 0,47±0,05 | 0,5±0,03 | 0,273 |
| | Regiones infartadas | ¹⁸ F-FDG | 0,126±0,022 | 0,231±0,011 | 0,028 |
| | | ¹³ N-amonio | 0,36±0,04 | 0,39±0,01 | 0,686 |
| | Regiones no infartadas | ¹⁸ F-FDG | 0,170±0,029 | 0,284±0,013 | 0,046 |
| | | ¹³ N-amonio | 0,59±0,07 | 0,62±0,06 | 0,5 |
| 30 | | | | | |

DISCUSION

Las principales conclusiones de este estudio son: 1. El trasplante directo de células miogénicas esqueléticas autólogas al miocardio de pacientes con historia de infarto de miocardio y sometidos a bypass aortocoronario es factible y seguro; 2. Aunque no se puede diferenciar claramente los efectos derivados del bypass de los derivados del trasplante celular, los estudios de funcionalidad y viabilidad sugieren que el trasplante de células miogénicas autólogas contribuye a mejorar la contractilidad del ventrículo izquierdo y a la reparación del tejido; 3. Los mioblastos esqueléticos son capaces de injertarse, al menos hasta los 3 meses después de la cirugía.

Aunque para comprobar si los mioblastos esqueléticos son capaces de injertarse adecuadamente sería necesario estudiar directamente el miocardio, el aumento de la retención de glucosa por PET indica claramente que en las áreas infartadas, donde no se detectaba tejido viable, empieza a detectarse tejido viable una vez realizado el trasplante. Por otra parte, aunque en el estudio no se incluyeron pacientes control, los resultados de ^{18}F -FDG PET para el paciente nº 9, al que solamente se le realizó el bypass aortocoronario por contaminación microbiológica del cultivo celular, no mostraron cambios significativos en la captación de glucosa a los 3 meses de seguimiento (Figura 2B), lo que sin ser concluyente sí es esperanzador.

Estos resultados demuestran que el bypass aortocoronario con trasplante de células miogénicas esqueléticas autólogas mejora notablemente la contractilidad cardíaca, evidenciada por el aumento de la fracción de eyección y particularmente por la disminución del índice WMSI. De estos resultados no puede concluirse que la mejora de la función cardíaca se derive solamente del bypass. El hecho de que los segmentos miocárdicos que recibieron trasplante celular hayan presentado mejoras mayores, con un aumento en la retención de glucosa en esos mismos segmentos, indica que la mejora de la función cardíaca no puede deberse exclusivamente al bypass. Para una demostración fehaciente de que el trasplante celular autólogo es responsable de la mejora en la función cardíaca sería necesario realizar el trasplante sin el concurso de otras terapias, algo que hoy no sería ético a menos que las células se implantasen por inyección percutánea.

Informes recientes sobre otros ensayos clínicos han sugerido que el trasplante de mioblastos esqueléticos autólogos está asociado con arritmias cardíacas (Menasche P et al. *Lancet* 2001; 357:279-280. Menasche P et al. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2003; 41: 1078-

1083. Hagege AA et al. *Lancet* 2003; 361:491-492. Pagani FD et al. *J Am. Coll. Cardiol.* 2003; 41:879-888). De hecho algunos pacientes han requerido del implante de desfibriladores intracardíacos. Por el momento no se conoce con certeza la causa de estas arritmias pero podrían estar relacionadas con la formación de circuitos de re-
5 entrada eléctricos (quizás porque no se establezcan uniones gap con los mioblastos esqueléticos implantados), el número y volumen de células implantadas, o el uso de suero fetal bovino para el cultivo y expansión de las células miogénicas autólogas. Es importante puntualizar que en estos protocolos se ha utilizado suero bovino fetal para el cultivo y expansión *in vitro* de las células miogénicas autólogas, lo que constituye una
10 fuente de proteínas xenogénicas. El contacto de las células humanas con el suero bovino durante 3 semanas conlleva la fijación en la superficie celular de dichas proteínas animales. El trasplante de estas células ocasionaría una reacción inflamatoria seguida de fibrosis. Los estudios clínico-patológicos realizados muestran que las células trasplantadas de esta manera están embebidas en una trama fibrótica en la que no ha
15 habido neovascularización. Esta configuración histológica representa un riesgo para los circuitos de re-entrada que pueden inducir la generación ectópica de arritmias ventriculares severas. A diferencia de estos estudios, en el presente ensayo clínico se han utilizado células miogénicas esqueléticas autólogas expandidas en medios de cultivos totalmente autólogos, evitando cualquier reacción inmune. Esto podría explicar por qué
20 en este ensayo clínico no se han observado estas arritmias.

REIVINDICACIONES

1. Un medio de cultivo autólogo de células madre-progenitoras autólogas humanas que comprende:
 - 5 a) entre 0,1% y 90% en peso de suero humano autólogo;
 - b) entre 0,1 y 10.000 UI/ml de heparina;
 - c) entre 0,1 y 10.000 UI/ml de protamina; y
 - d) un medio de cultivo con nutrientes básicos con o sin glutamina, en cantidad suficiente hasta el 100% en peso.
- 10 2. Medio de cultivo según la reivindicación 1, en el que dicho suero autólogo humano ha sido sometido a un tratamiento con el fin de inactivar el complemento.
3. Medio de cultivo según la reivindicación 1, en el que dicho suero autólogo humano ha sido obtenido a partir de muestras sanguíneas del paciente.
- 15 4. Medio de cultivo según la reivindicación 1, en el que dicho suero autólogo humano ha sido obtenido mediante la realización de una plasmaféresis al paciente donante de dicho suero.
- 20 5. Medio de cultivo según la reivindicación 4, en el que dicha plasmaféresis se realiza utilizando heparina como anticoagulante y sulfato de protamina para revertir la anticoagulación.
- 25 6. Medio de cultivo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende, además, un antibiótico.
7. Medio de cultivo según la reivindicación 6, en el que dicho antibiótico se selecciona entre penicilina, estreptomicina, gentamicina y sus mezclas.
- 30 8. Medio de cultivo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende, además, anfotericina B y/o un factor de crecimiento de fibroblastos (FGF).

9. Medio de cultivo según la reivindicación 1, que comprende:
89% de medio HAM-F12;
10% de suero humano autólogo del paciente;
heparina 0,1 a 100 UI/ml;
5 protamina 0,1 a 100 UI/ml; y
1% de penicilina/estreptomicina y, opcionalmente,
0,25 mg/ml de anfotericina B y/o
0,1 a 250 pg/ml de bFGF recombinante.
10. Un método para la preparación de un medio de cultivo autólogo de células madre-progenitoras autólogas humanas, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende la mezcla de suero humano autólogo, heparina, protamina, nutrientes básicos con o sin glutamina, junto con, opcionalmente, antibióticos, y/o anfotericina B y/o un factor de crecimiento de fibroblastos.
15. 11. Método según la reivindicación 10, en el que dicho suero autólogo humano ha sido obtenido por plasmaféresis.
20. 12. Empleo de un medio de cultivo autólogo de células madre-progenitoras autólogas humanas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para el cultivo *in vitro*, purificación y expansión de células madre-progenitoras autólogas humanas.
25. 13. Un método para la preparación de una composición de células madre-progenitoras autólogas humanas, que comprende incubar dichas células madre-progenitoras autólogas humanas en un medio de cultivo autólogo de células madre-progenitoras autólogas humanas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y purificar las células madre-progenitoras autólogas humanas obtenidas.
30. 14. Método según la reivindicación 13, en el que la purificación de las células madre-progenitoras autólogas humanas obtenidas se realiza mediante el empleo de anticuerpos específicos y selectivos para dichas células madre-progenitoras autólogas humanas, que permiten la identificación de antígenos extracelulares característicos de dichas células madre-progenitoras autólogas humanas.

15. Método según la reivindicación 14, en el que dichos anticuerpos específicos y selectivos para dichas células madre-progenitoras autólogas humanas están unidos a microesferas magnéticas.

5

16. Un método para la obtención de células madre-progenitoras musculares autólogas humanas, útiles para su empleo en terapia celular, que comprende incubar dichas células madre-progenitoras musculares autólogas humanas en un medio de cultivo autólogo de células madre-progenitoras autólogas humanas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, y purificar las células madre-progenitoras musculares autólogas humanas obtenidas.

17. Método según la reivindicación 16, en el que la purificación de las células madre-progenitoras musculares autólogas humanas comprende el empleo de anticuerpos anti-CD56 humano, opcionalmente, unidos a microesferas magnéticas, y la selección de las células que manifiestan un fenotipo CD56+/CD45-.

18. Método según la reivindicación 16, en el que la purificación de las células madre-progenitoras musculares autólogas humanas comprende someter al cultivo celular a un paso de pre-siembra con el fin de sedimentar la totalidad o parte de los fibroblastos presentes en dicho cultivo celular y, posteriormente, identificar y separar las células madre-progenitoras musculares autólogas humanas mediante el empleo de anticuerpos anti-CD56 humano, opcionalmente, unidos a microesferas magnéticas, y la selección de las células que manifiestan un fenotipo CD56+/CD45-.

25

19. Un procedimiento para la obtención de células madre-progenitoras musculares autólogas humanas, a partir de una biopsia de tejido muscular, para la preparación de una composición farmacéutica, que comprende:

30 a) la realización de una biopsia en un paciente objeto del posterior implante de células madre-progenitoras musculares autólogas humanas para extraer un fragmento de tejido de músculo esquelético que comprende células madre-progenitoras musculares autólogas humanas;

- 5 b) el cultivo de dichas células madre-progenitoras musculares autólogas humanas procedentes del músculo esquelético en un medio de cultivo autólogo de células madre-progenitoras autólogas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, bajo condiciones que permiten la expansión de dichas células madre-progenitoras musculares autólogas humanas cultivadas;
- 10 c) la purificación de dichas células madre-progenitoras musculares autólogas humanas cultivadas; y
- d) la recolección de dichas células madre-progenitoras musculares autólogas humanas purificadas; y, opcionalmente,
- 15 e) la congelación de dichas células madre-progenitoras musculares autólogas humanas purificadas hasta la preparación de dicha composición farmacéutica.

20 20. Procedimiento según la reivindicación 19, que comprende la administración local al paciente, en la zona de la biopsia, antes de realizarla, de una composición farmacéutica que comprende un agente farmacológico que estimula la proliferación de las células madre-progenitoras musculares autólogas humanas.

25 21. Procedimiento según la reivindicación 19, en el que dicho agente farmacológico comprende un anestésico local, seleccionado entre lidocaína y bupivacaína.

30 22. Método según la reivindicación 19, en el que la purificación de las células madre-progenitoras musculares autólogas humanas comprende someter al cultivo celular a un paso de pre-siembra para sedimentar la totalidad o parte de los fibroblastos presentes en dicho cultivo celular y, posteriormente, identificar y separar las células madre-progenitoras musculares autólogas humanas mediante el empleo de anticuerpos

anti-CD56 humano, opcionalmente, unidos a microesferas magnéticas, y la selección de las células que manifiestan un fenotipo CD56+/CD45-.

23. Composición enriquecida en células madre-progenitoras musculares autólogas humanas que comprende, al menos, un 70% de dichas células madre-progenitoras musculares autólogas humanas.

24. Composición farmacéutica que comprende, al menos, 20 millones de células, con una densidad celular de, al menos, 50 millones de células/ml y, al menos, 40% de células madre-progenitoras autólogas CD56+/CD45-, medio de cultivo autólogo de células madre-progenitoras autólogas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, y, al menos, un excipiente farmacéuticamente aceptable.

25. Composición farmacéutica según la reivindicación 24, que comprende entre 20 y 200 millones de células, con una densidad celular comprendida entre 50 y 70 millones de células/ml y, al menos, 70% de células madre-progenitoras autólogas CD56+/CD45-, medio de cultivo autólogo de células madre-progenitoras autólogas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, y, albúmina humana en una cantidad comprendida entre 0,1% y 20% en peso respecto al total.

26. Un procedimiento terapéutico de cardiomioplastia celular autóloga para crear, regenerar y reparar tejido miocárdico disfuncional mediante el implante de una composición farmacéutica que comprende células madre-progenitoras musculares autólogas humanas, regeneradoras de tejido cardíaco, expandidas y mantenidas *ex vivo* en un medio de cultivo autólogo; comprendiendo dicho procedimiento recoger una muestra de material procedente del cuerpo del paciente objeto del implante posterior que comprende células madre-progenitoras musculares autólogas humanas, expandir dichas células mediante cultivo en un medio de cultivo autólogo de células madre-progenitoras autólogas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, e implantar las células madre-progenitoras autólogas humanas recolectadas en el paciente al que previamente se le había extraído dicho material conteniendo las células madre-progenitoras musculares autólogas.

27. Un procedimiento terapéutico de cardiomioplastia celular autóloga para crear, regenerar y reparar tejido miocárdico disfuncional mediante el implante de una composición farmacéutica que comprende células madre-progenitoras musculares autólogas humanas, regeneradoras de tejido cardíaco, expandidas y mantenidas *ex vivo* en un medio de cultivo autólogo; y donde dicho procedimiento comprende los siguientes pasos:

- a) la toma al paciente de una biopsia de músculo esquelético tomada de un músculo, preferentemente, preacondicionado mediante una inyección intramuscular de un anestésico local;
- b) la preparación de un medio de cultivo de las células madre-progenitoras autólogas humanas, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, a partir de suero autólogo del paciente;
- c) la preparación de una composición enriquecida de células madre-progenitoras musculares autólogas humanas a partir de la biopsia de a) y del medio de cultivo de b);
- d) la preparación de una composición farmacéutica a partir de la composición de c); y
- e) el implante de la composición farmacéutica de células madre-progenitoras autólogas humanas de d) en lesiones miocárdicas.

28. Procedimiento según la reivindicación 27, en el que el implante de dicha composición de células madre-progenitoras autólogas humanas se realiza mediante inyección directa en la región periférica a la cicatriz del infarto o por inyección en los espacios intercoronarios de ambos ventrículos.

29. Procedimiento según la reivindicación 27, en el que el implante de dicha composición de células madre-progenitoras autólogas humanas se realiza mediante administración sistémica o intracoronaria mediante acceso venoso percutáneo.

30. Procedimiento según la reivindicación 27, en el que el implante de dicha composición de células madre-progenitoras autólogas humanas se realiza mediante un sistema robotizado y computerizado.

1/1

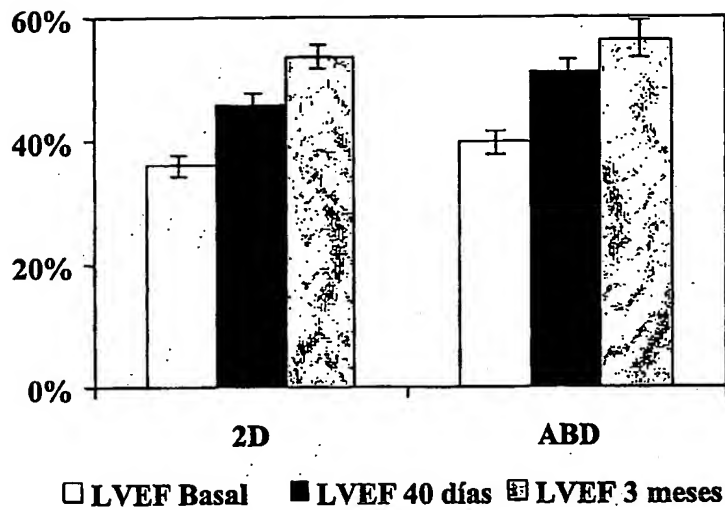


FIGURA 1

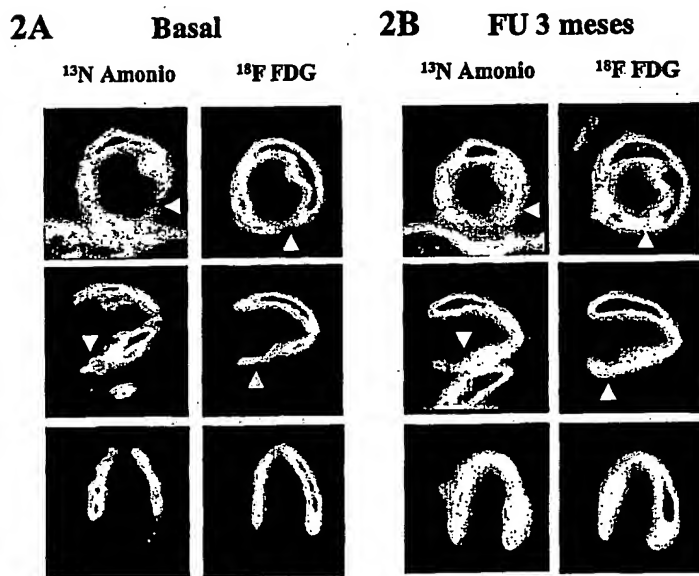


FIGURA 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES03/00285

| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER | | |
|--|--|--|
| IPC 7 C12N5/02, C12N5/08, A61K35/34, A61P21/00 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
| B. FIELDS SEARCHED | | |
| Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N5 | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched | | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAPLUS, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, WPI | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | WO 0107568 A2 (DIACRIN INC.) 01 February 2001 | 23 |
| A | POUZET ET AL., Intramyocardial transplantation of autologous myoblasts. Circulation 2000; 102:III-210 | 1-30 |
| A | CHANG-QING XIA ET AL., Hepatin induces differentiation of CD1a+ dendritic cells from monocytes: phenotypic and functional characterization. The Journal of Immunology 2002 168 (3) 1131-1138 | 1-30 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex. | | |
| <p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p> | | |
| Date of the actual completion of the international search 11 September 2003 (11. 09. 03) | | Date of mailing of the international search report 25 September 2003 (25. 09. 03) |
| Name and mailing address of the ISA/ S. P. T. O. | | Authorized officer |
| Facsimile No. | | Telephone No. |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES03/00285

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| A | HANKEY D. ET AL, Enhancement of human osteoblast proliferation and phenotypic expression when cultured in human serum. Acta Orthop Scand 2001; 72(4) : 395-403 | 1-30 |
| A | MCALINDEN M.G. ET AL., Comparison of cancellous bone-derived cell proliferation in autologous human and fetal bovine serum. Cell Transplantation 2000 vo.1 9, pp 445-451 | 1-30 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES03/00285

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 26-30 (partially)
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/ES03/00285

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---------------------|--|--|
| WO0107568 | 02-01-2001 | EP1200559 AU5200062346 JP2003505475T | 02-05-2002 13-02-2001 12-02-2003 |

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°
PCT/ES03/00285

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

CIP⁷ C12N5/02, C12N5/08, A61K35/34, A61P21/00

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima consultada (sistema de clasificación, seguido de los símbolos de clasificación)

CIP⁷ C12N5

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

CAPLUS, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, WPI

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

| Categoría* | Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes | Relevante para las reivindicaciones n° |
|------------|--|--|
| X | WO 0107568 A2 (DIACRIN INC.) 1 febrero 2001 | 23 |
| A | POUZET ET AL., Intramyocardial transplantation of autologous myoblasts. Circulation 2000; 102:III-210 | 1-30 |
| A | CHANG-QING XIA ET AL., Hepatin induces differentiation of CD1a+ dendritic cells from monocytes: phenotypic and functional characterization. The Journal of Immunology 2002 168 (3) 1131-1138 | 1-30 |

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos ☒ Los documentos de familia de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:

"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.

"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.

"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.

"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.

"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.

"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.

"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional. 11.09.2003

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

25 SEP 2003 25.09.03

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M.

Funcionario autorizado

Marta Hernández Cuéllar

C/Panamá 1, 28071 Madrid, España.
n° de fax +34 91 3495304

n° de teléfono + 34 91 3495545

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ ES03/00285

| C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES | | |
|--|---|--|
| Categoría * | Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes | Relevante para las reivindicaciones n° |
| A | HANKEY D. ET AL, Enhancement of human osteoblast proliferation and phenotypic expression when cultured in human serum. Acta Orthop Scand 2001; 72(4) : 395-403 | 1-30 |
| A | MCALINDEN M.G. ET AL., Comparison of cancellous bone-derived cell proliferation in autologous human and fetal bovine serum. Cell Transplantation 2000 vol.9, pp 445-451 | 1-30 |

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES03/00285

Recuadro I Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (Continuación del punto 2 de la primera hoja)

De conformidad con el artículo 17.2.a), algunas reivindicaciones no han podido ser objeto de búsqueda por los siguientes motivos:

1. ☒ Las reivindicaciones n°: 26-30 (parcialmente) se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:
las reivindicaciones 26-30 se refieren a un método de tratamiento terapéutico o diagnóstico del cuerpo humano. A pesar de ello, la búsqueda se ha realizado para estas reivindicaciones en base a los efectos atribuidos a los compuestos empleados en dicho procedimiento
2. ☐ Las reivindicaciones n°: se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:
3. ☐ Las reivindicaciones n°: son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la regla 6.4.a).

Recuadro II Observaciones cuando falta unidad de invención (Continuación del punto 3 de la primera hoja)

La Administración encargada de la Búsqueda Internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:

1. ☐ Dado que todas las tasas adicionales han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.
2. ☐ Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda pueden serlo sin un esfuerzo particular que justifique una tasa adicional, esta Administración no ha invitado al pago de ninguna tasa de esta naturaleza.
3. ☐ Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales solicitadas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones n°:
4. ☐ Ninguna de las tasas adicionales solicitadas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones n°:

Indicación en cuanto a la reserva ☐ Las tasas adicionales han sido acompañadas de una reserva por parte del solicitante.

☐ El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna reserva.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL
Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional n°

PCT/ES03/00285

| Documento de patente citado en el informe de búsqueda | Fecha de publicación | Miembro(s) de la familia de patentes | Fecha de publicación |
|--|-------------------------|---|-------------------------|
| WO0107568 | 02-01-2001 | EP1200559 | 02-05-2002 |
| | | AU5200062346 | 13-02 -2001 |
| | | JP2003505475T | 12-02-2003 |